

UNTERSUCHUNGEN ZUR ALTERSBESTIMMUNG
AN SPERMA SPUREN NACH FLUOROCHROMIERUNG

Erwin SATZGER

1981

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Wolfgang Spann

Untersuchungen zur Altersbestimmung
an Spermaspuren nach Fluorochromierung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Erwin Satzger

aus

Landsberg

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: *Prof. Dr. H. D. TRÖGER*

Mitberichterstatter: *Prof. Dr. W. SPANN*

Dekan: *Prof. Dr. W. SPANN*

Tag der mündlichen Prüfung: 2. 7. 1981



Inhalt

	Seite
1. Einführung und Problemstellung	3
2. Material und Methode	6
2.1 Untersuchungsmaterial	6
2.2 Untersuchungsmethode	6
2.2.1 Färbetechnik	6
2.2.2 Auswertung	7
3. Ergebnisse	9
3.1 Ergebnis des 1. Versuchs	9
3.2 Ergebnis des 2. Versuchs	11
3.3 Mathematische Aufbereitung der Ergebnisse	12
3.4 Graphische Darstellung der Ergebnisse	18
3.5 Mittelwertbestimmung und Vergleich der Einzelkurven	27
4. Diskussion	37
5. Zusammenfassung	43
6. Literaturverzeichnis	44

1. Einführung und Problemstellung

Die Altersbestimmung von Spermaflecken ist in der Rechtsmedizin von Interesse, weil dem Alter solcher Spuren bei der Rekonstruktion von Tathergängen eine große Bedeutung zukommt.

Einen ersten Versuch, hierfür eine Methode zu finden, machte WEINIG (31) 1954, indem er die Auswanderung der in Spermaflecken vorhandenen Chloridionen aus dem ursprünglichen Fleckenbezirk untersuchte.

Einen neuen Weg scheint nun die Präparatfärbung mit fluoreszierenden Acridinderivaten zu eröffnen. CASPERSSON et al. (5,6,7,) entdeckten 1968 und 1969, daß pflanzliche und tierische Chromosomen in der Metaphase bei Anfärbung mit gewissen Acridinderivaten, z.B. Quinacrine Mustard, Abschnitte mit unterschiedlicher Anfärbbarkeit besaßen. Wenig später wiesen sie mit dieser Technik auch beim Menschen die Existenz eines Bandenmusters nach, das für jedes Paar der 22 Autosomen und die beiden Geschlechtschromosomen X und Y spezifisch ist (8,9). Damit konnte erstmals jedes Chromosom individuell charakterisiert, homologe Partner klar erkannt und ihre Zugehörigkeit innerhalb des Karyotyps des Menschen sicher festgelegt werden.

Kurz darauf gaben PEARSON et al. (22) bekannt, daß menschliche Chromosomen auch in der Interphase durch Fluorochromierung unterscheidbar sind.

Insbesondere fluoresziert der distale Teil des langen Arms des Y-Chromosoms sehr stark und kann nicht nur in der Metaphase, wie ZECH (32) schon 1969 besonders erwähnte, sondern auch in der Interphase als relativ intensiv leuchtender Punkt von ca. 2 - 5 μ Durchmesser im Auflichtmikroskop leicht identifiziert werden. (PEARSON et al. (22)).

Dieser Punkt wird heute in der Literatur allgemein als "Y-Body" bezeichnet, ist aber auch als "F-Body", "male Chromatin Body", "male Barr-Body", "Y-Fluoreszenzkörperchen" erwähnt worden.

Über den Vorgang der Bindung des Fluorochroms an bestimmte Chromosomenabschnitte gaben CASPERSSON et al. (5) zwei Mechanismen an. Danach "schiebt" sich der Farbstoff an bestimmten Stellen des Chromosoms zwischen die Stränge der Doppelhelix und außerdem geht die aliphatische Seitenkette des Acridinderivats eine Ionenbindung mit den Phosphorsäure-Gruppen der DNS ein. Für Quinacrine Mustard vermutete CASPERSSON zusätzlich eine Bindung der alkylierenden Gruppe an das N-7-Atom des Guanins.

Es spricht vieles für den Mechanismus des Einlagerns, da der chemisch verschiedene Farbstoff Giemsa bei besonderen präparatorischen Bedingungen zu fast ähnlichen Mustern wie die Fluorochromierung mit Quinacrine Mustard führt (SCHWINGER (28)).

Mit dieser Methode der Fluorochromierung wurden Untersuchungen an verschiedenen Geweben, u.a. auch an Blutspuren und Haaren, angestellt und dabei eine zeitliche Nachweisgrenze des Y-Bodies festgestellt (TRÜGER, et al. (30)).

Je älter folglich ein Gewebstück bzw. eine Blutspur ist, desto weniger Y-Bodies pro 100 untersuchter Zellen konnten nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wird nun versucht, dieses Phänomen bei Spermaspuren zu untersuchen und aus etwaigen Gesetzmäßigkeiten eine Methode zur Altersbestimmung solcher Spuren zu entwickeln.

2. Material und Methode

2.1. Untersuchungsmaterial

Aus frisch gewonnenen Ejakulaten von fünf jungen, gesunden Männern im Alter von 20 bis 30 Jahren wurden auf weißen Leinenflecken Spermaspuren angelegt, die als Spur Nr. 1 bis 5 bezeichnet wurden. Etwa einen Monat später wurden zur Kontrolle nochmals drei Spermaspuren angelegt, Spur Nr. 6 bis 8. Die Spuren hatten eine graugelbe Färbung und wiesen eine landkartenähnliche Begrenzung mit dunklem Rand auf. Das Textilstück war an der Spurenstelle von einer wie gestärkt erscheinenden Steifheit.

2.2. Untersuchungsmethode

2.2.1 Färbetechnik

Aus der wie oben beschriebenen und gut erkennbaren Spurenstelle des Leinenfleckens wurde ein ca. 1 x 2 cm großes Stück herausgeschnitten und auf einen Objektträger gelegt. Mittels einer Pipette wurde es dann mit einigen Tropfen 25-prozentiger Essigsäure benetzt. Nach 5 - 10 Minuten wurde das Stück Stoff mit zwei Pinzetten gut geknetet und schließlich ein Tropfen Flüssigkeit auf den Objektträger ausgepreßt.

Der Tropfen wurde mit der Pinzette auf etwa Deckglasgröße auf dem Objektträger verteilt. Danach wurde das Präparat an der Luft getrocknet.

Die Anfärbung erfolgte in 0,01-prozentiger Quinacrine Mustardlösung, in die jeder Objektträger 15 Minuten lang getaucht wurde. Danach wurde er für fünf Minuten in frisches Wasser gestellt und dann mit Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,0) eingedeckt. Auf den Objektträger wurde vorsichtig ein Deckglas gelegt, dessen Rand mit Nagellack abgedichtet wurde, um ein vorzeitiges Austrocknen zu verhindern.

Zur Herstellung der Färbelösung wurde der Fluoreszenzfarbstoff "Quinacrine Mustard" (Firma Serva, Heidelberg) in Phosphat-Citrat-Puffer nach Mc Ilvaine (pH 4,4) in einer Konzentration von 0,1 mg/ml gelöst. Sie wurde im Kühlschrank aufbewahrt und bei beginnender Trübung vor einem neuen Färbevorgang filtriert.

2.2.2. Auswertung

Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit dem LEITZ-WETZLAR Auflichtfluoreszenzmikroskop "ORTHOLUX II" mit Binokulartubus, einer Quecksilber-Höchstdrucklampe HBV 50 W und den Filtern BG 38 blau und KH 510. Die

Präparate wurden unter fluoreszenzfreier Ölimmersion ($n_D = 1,515$, $v = 49$) bei 200 und 1000-facher Vergrößerung betrachtet.

Das Untersuchungsmaterial stellte sich in der typischen gelbgrünen Fluoreszenz dar. Die Spermien selber waren als ovale Zellen zu erkennen, die die Spermienköpfe darstellen. Sie bestanden aus einem chromatindichten, gelbgrün leuchtenden und einem chromatinarmen, dunklen Teil. Das Y-Body der Androspermien war als stark leuchtender, in einigen Fällen zweigeteilter Punkt meist am Übergang vom chromatindichten zum chromatinarmen Teil zu finden. In manchen Fällen war der Schwanzteil des Spermiums zu erkennen.

Jeder Objektträger wurde rasterartig unter dem Mikroskop betrachtet, bei jedem Präparat 100 Spermienköpfe gesucht und die Anzahl Y-Bodies enthaltender Spermien gezählt. Dieses Ergebnis wird im folgenden als Zellindex bezeichnet. Es entspricht dem prozentualen Anteil der erkennbaren Androspermien zur untersuchten Gesamtzahl.

$$\text{Zellindex (\%)} = \frac{\text{Y-Body positive Zellen}}{100 \text{ ausgezählte Zellen}}$$

Um mögliche Fehler durch Überprojektionen zu vermeiden, wurden nur einzeln liegende Spermien berücksichtigt und konglomeratartig zusammenliegende ausgelassen.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnis des 1. Versuchs

Die Tabelle I enthält die Ergebnisse der ersten Untersuchungsreihe, die sich über drei Monate erstreckte und mit einer Schlußuntersuchung nach fünf Monaten abgeschlossen wurde. Da des öfteren Versuche wiederholt werden mußten, reichte das Spurenmaterial nicht aus, um die Versuche weiter fortzusetzen. Außerdem waren die angefärbten Y-Bodies immer schlechter von Artefakten zu unterscheiden.

Tabelle I	Spur-Nummer					
	Tage	1	2	3	4	5
	3	64	50	44	51	49 (% F-Body)
	6	64	45	45	48	46
	15	57	39	41	45	48
	18	55	48	39	49	50
	24	50	38	37	33	38
	27	52	36	32	36	43
	30	44	33	32	33	40
	36	48	37	29	30	35
	39	45	33	27	31	36
	45	38	30	32	29	33
	51	39	24	26	27	32
	60	33	29	25	24	26
	72	37	39	13	14	23
	78	28	28	15	19	21
	93	24	20	11	12	15
	159	16	14	10	11	13

Ergebnisse der ersten Versuchsreihe.

F-Body-Frequenz in Abhängigkeit zum Spurenalter.

3.2. Ergebnis des 2. Versuchs

Tabelle II enthält die Ergebnisse eines Kontrollversuches, der einen Monat später gestartet wurde und sich über zwei Monate erstreckte und ebenfalls mit einem Schlußversuch nach ca. fünf Monaten abgeschlossen wurde.

Tabelle II	Tage	Spur-Nummer			
		6	7	8	
	3	49	46	42	(% F-Body)
	6	45	43	41	
	12	40	35	40	
	18	46	30	32	
	24	35	24	36	
	27	36	26	39	
	30	36	26	37	
	36	24	8	40	
	45	35	6	32	
	60	32	10	35	
	168	19	6	22	

Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe.

F-Body-Frequenz in Abhängigkeit zum Spurenalter.

3.3. Mathematische Aufbereitung der Ergebnisse

Um die Ergebnisse besser miteinander vergleichen zu können, werden sie im folgenden mathematisch aufbereitet. Dabei wird vereinfachend angenommen, daß die Datenpunkte auf einer Geraden liegen, die durch die lineare Gleichung der Form $y = mx + b$ bestimmt ist, wobei m der Steigung und b dem Schnittpunkt der Geraden mit der y -Achse entspricht, in unserem Fall also dem Zellindex am Tage 0. Ein allgemein übliches Verfahren ist hier die Kleinstquadrat-Methode, bei der die Summe der Quadrate der Abweichungen der tatsächlichen Datenpunkte von der besten Anpassung der Geraden ein Minimum beträgt. Man legt gewissermaßen durch die graphische Darstellung der Datenpunkte die Gerade, die die Datenpunkte gleichförmig trennt. Steigung und Schnittpunkt mit der y -Achse können wie folgt bestimmt werden, wobei $(x_i; y_i)$ ein beliebiges Datenpaar ist.

$$m = \frac{\frac{\sum x_i \sum y_i}{N} - \sum x_i y_i}{\frac{(\sum x_i)^2}{N} - \sum x_i^2}$$

$$b = \bar{y} - m \bar{x}$$

$$\text{mit: } \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^N y_i}{N}$$

Um die tatsächliche Übereinstimmung dieser Anpassung der Geraden mit den Datenpunkten beurteilen zu können, errechnet man einen Korrelationskoeffizienten r , der sich aus den Datenpunkten $(x_1; y_1) \dots (x_n; y_n)$ und den Parametern der Geraden ermitteln läßt:

$$r = m \cdot \frac{\sigma_x}{\sigma_y} \quad \sigma_x = \sqrt{\sigma_x^2}$$

$$\sigma_y = \sqrt{\sigma_y^2}$$

$$\text{wobei: } \sigma_x^2 = \frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N} - \bar{x}^2$$

= Varianz der x-Werte

$$\sigma_y^2 = \frac{\sum_{i=1}^N y_i^2}{N} - \bar{y}^2$$

Um sich den Verlauf dieser Geraden besser vorstellen zu können, wird der Schnittpunkt mit der x-Achse als Punkt a_0 und der Schnittpunkt mit einer Parallelen zur x-Achse durch den y-Punkt 10% als Punkt a_{10} errechnet. Der

10 % Punkt a_{10} wird angegeben, da das Ergebnis der Spur 7 darauf hindeutet, daß auch nach längerer Liegedauer ein gewisser Prozentsatz der Spermien einen stärker fluoreszierenden Punkt aufweisen, der als Y-Body erscheint. Ob es sich dabei tatsächlich um das Y-Chromosom oder um einen Artefakt und somit um einen falschen positiven Befund handelt, läßt sich bei dieser Versuchsserie nicht entscheiden.

a_0 errechnet sich aus der Gleichung: $y = mx + b$
für $y = 0$

a_{10} entsprechend für $y = 10$

Jede der graphischen Darstellungen der acht Spuren wird durch folgende Geraden charakterisiert:

- A Gerade durch die Meßpunkte des 1. Monats (3.-30.Tag)
- B Gerade durch die Meßpunkte des 2. Monats (30.-60.Tag)
- C Gerade durch die Meßpunkte des 1.u.2. Monats (3.-60.Tag)
- D Gerade durch die Meßpunkte der ersten 3 Monate (3.-93.Tag)
- E Gerade durch alle Meßpunkte (3. - 159.bzw. 168.Tag)

Bei den Spuren 6,7 und 8 entfällt natürlich Gerade D.

Die Geraden werden, wie oben ausführlich erläutert, durch folgende Angaben gekennzeichnet:

- b (x = 0)
- m (Steigung)
- a₀ (y = 0)
- a₁₀ (y = 10)
- r (Korrelationskoeffizient)

Spur 1, Spender 28 Jahre, siehe Bild 1:

	A(3.-30.)	B(30.-60.)	C(3.-60.)	D(3.-93.)	E(3.-159.)
b	68	61	65	63	59
m	0,75	0,45	0,55	0,44	0,33
a ₀	90	136	119	143	179
a ₁₀	77	114	101	120	149
r	0,99	0,88	0,98	0,97	0,94

Spur 2, Spender 23 Jahre, siehe Bild 2:

b	51	43	49	45	44
m	0,53	0,29	0,40	0,25	0,21
a ₀	96	152	121	179	209
a ₁₀	77	117	96	140	161
r	0,84	0,70	0,90	0,80	0,85

Spur 3, Spender 21 Jahre, siehe Bild 3:

	A(3.-30.)	B(30.-60.)	C(3.-60.)	D(3.-93.)	E(3.-159.)
b	47	37	45	45	41
m	0,49	0,20	0,37	0,39	0,26
a ₀	96	189	120	116	156
a ₁₀	75	137	93	90	118
r	0,96	0,70	0,94	0,97	0,90

Spur 4, Spender 22 Jahre, siehe Bild 4:

b	54	41	51	50	44
m	0,68	0,29	0,50	0,44	0,29
a ₀	80	145	102	113	154
a ₁₀	65	110	82	90	119
r	0,89	0,98	0,94	0,96	0,88

Spur 5, Spender 24 Jahre, siehe Bild 5:

b	50	52	52	49	46
m	0,32	0,42	0,41	0,38	0,26
a ₀	160	124	127	131	177
a ₁₀	128	100	102	104	138
r	0,70	0,97	0,94	0,86	0,84

Spur 6, Spender 22 Jahre, siehe Bild 6

	A(3.-30.)	B(30.- 60.)	C(3.-60.)	D(3.-93.)	E(3.-168.)
b	49	39	46	entfällt	43
m	0,46	0,11	0,28		0,16
a ₀	107	346	185		212
a ₁₀	85	257	129		210
r	0,85	0,86	0,85		0,89

Spur 7, Spender 28 Jahre, siehe Bild 7

b	47	29	44	entfällt	32
m	0,80	0,39	0,73		0,22
a ₀	58	75	61		149
a ₁₀	46	49	47		102
r	0,96	0,56	0,92		0,68

Spur 8, Spender 24 Jahre, siehe Bild 8

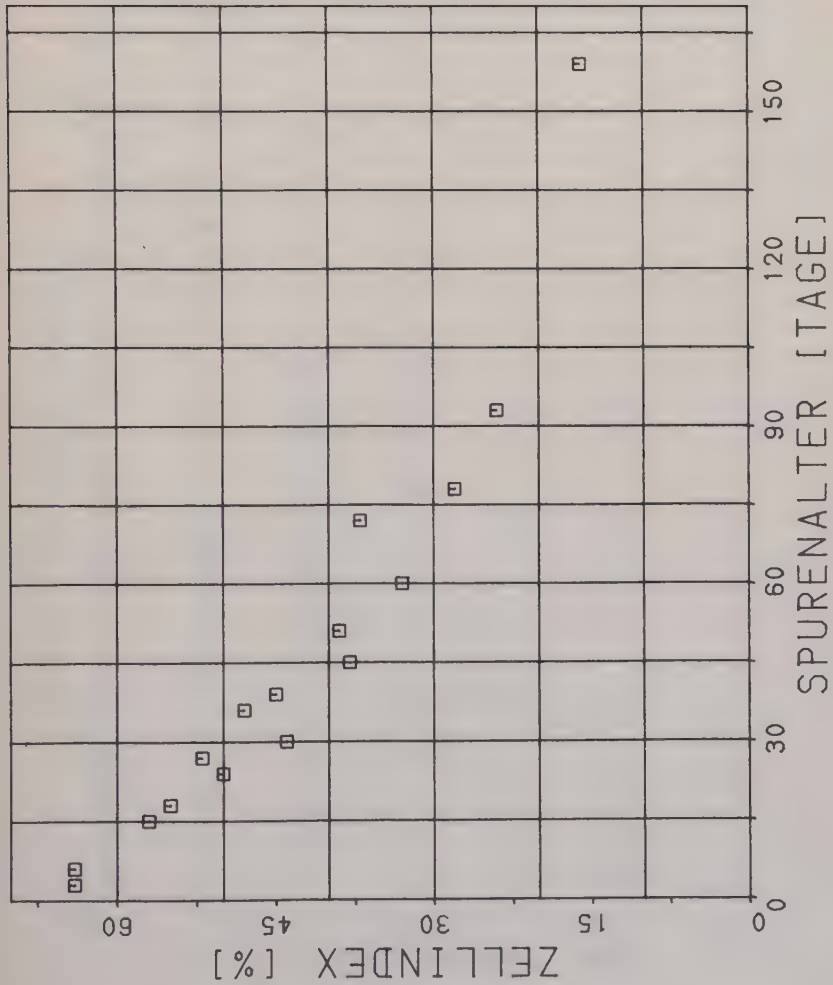
b	41	41	40	entfällt	40
m	0,18	0,13	0,12		0,11
a ₀	224	321	350		368
a ₁₀	169	244	263		276
r	0,56	0,50	0,57		0,87

3.4. Graphische Darstellung der Ergebnisse

Bei den graphischen Darstellungen ist auf der x-Achse das Spurenalter in Tagen, auf der y-Achse der Zellindex in Prozent aufgetragen.

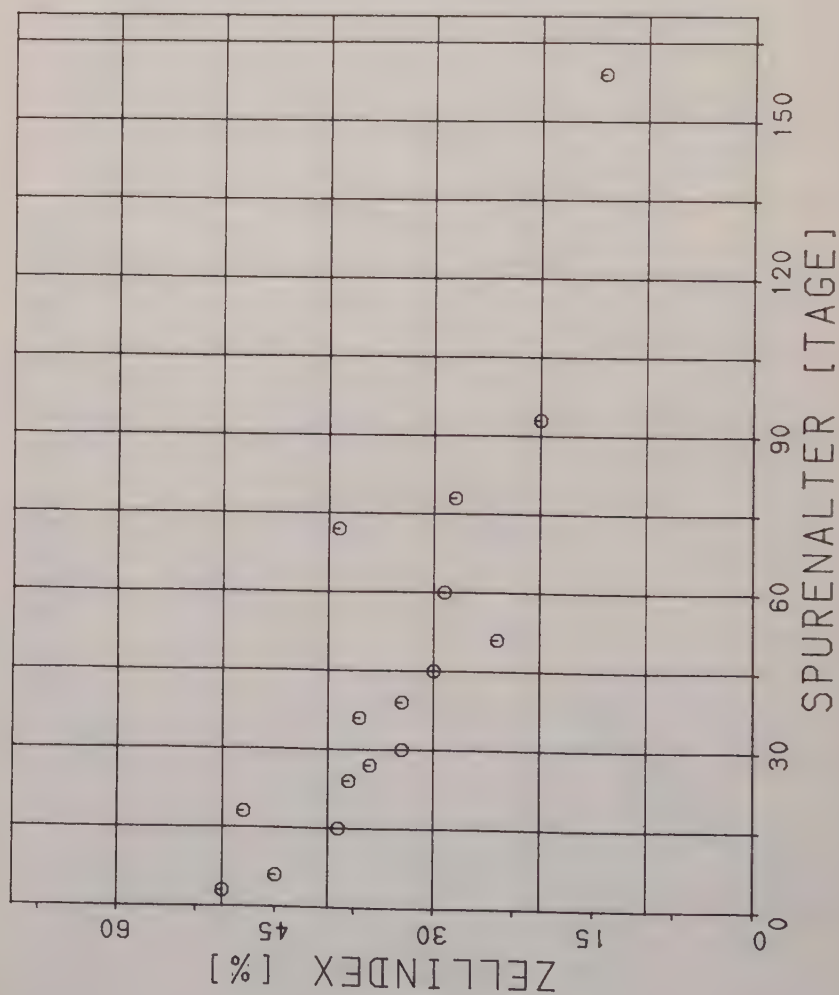
ERGEBNIS SPUR 1

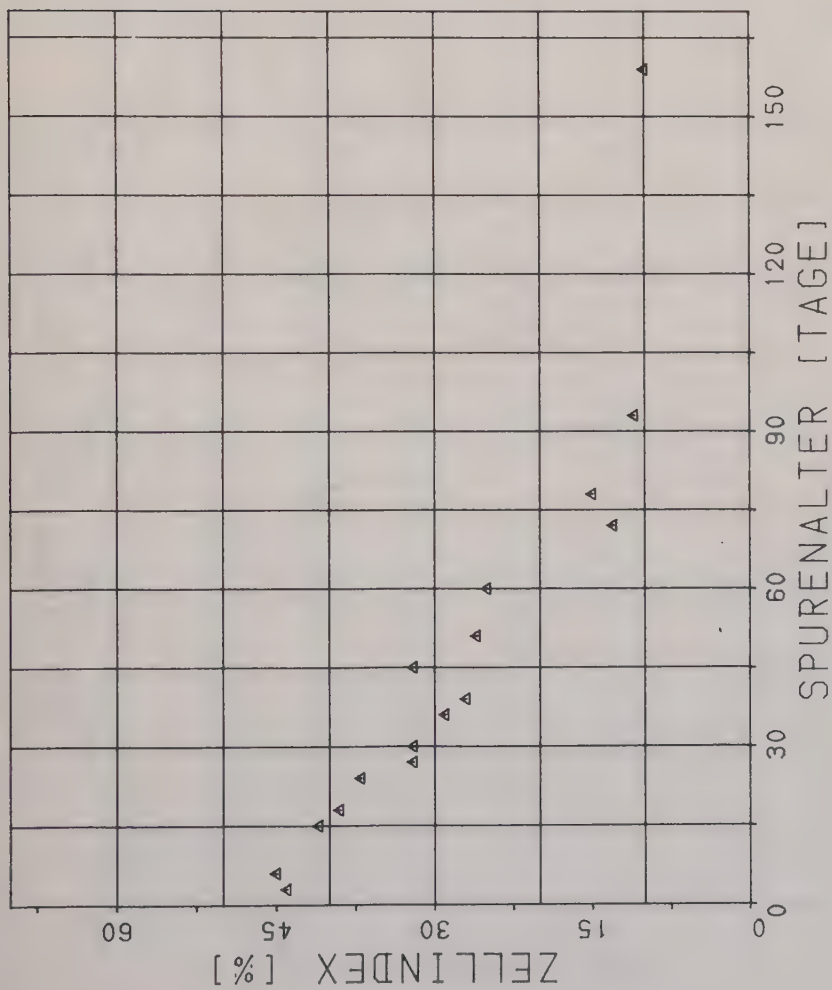
BILD
1



ERGEBNIS SPUR 2

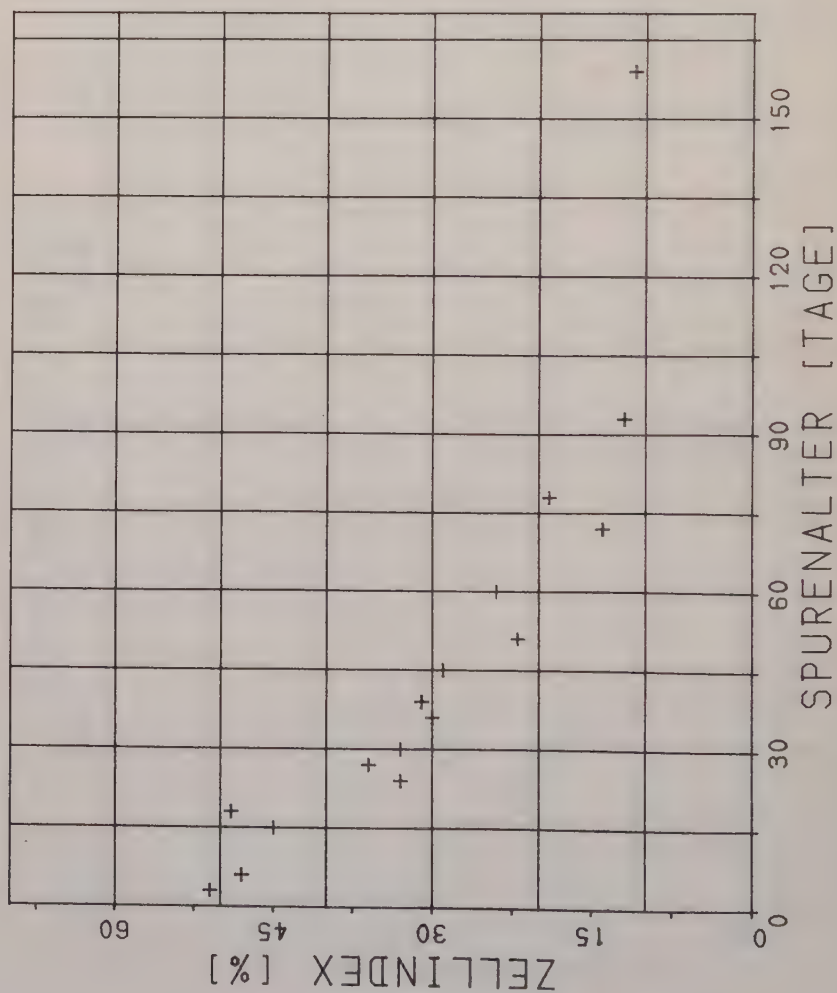
BILD
2





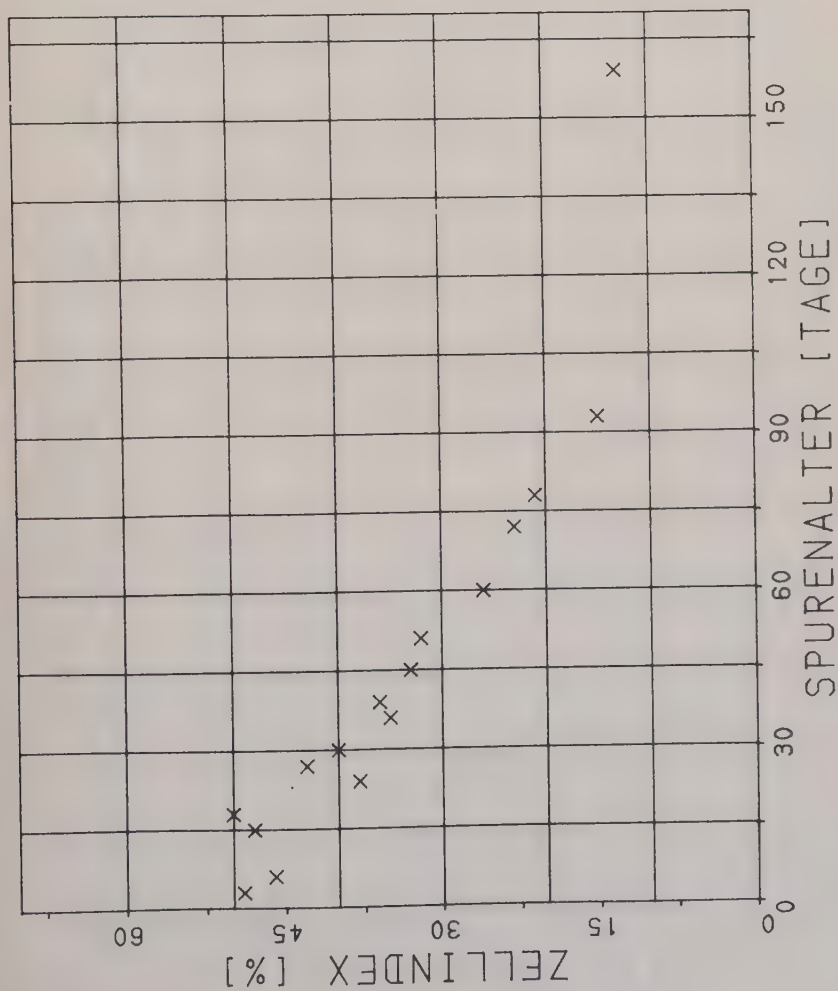
ERGEBNIS
SPUR 4

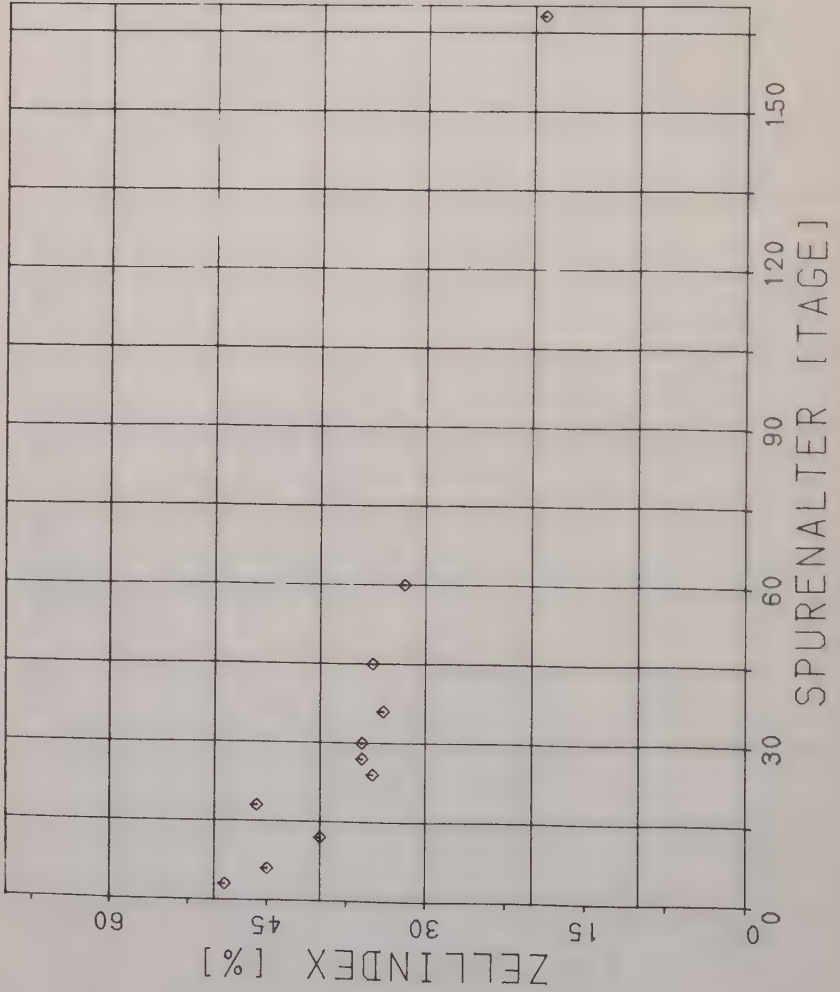
BILD
4



ERGEBNIS
SPUR 5

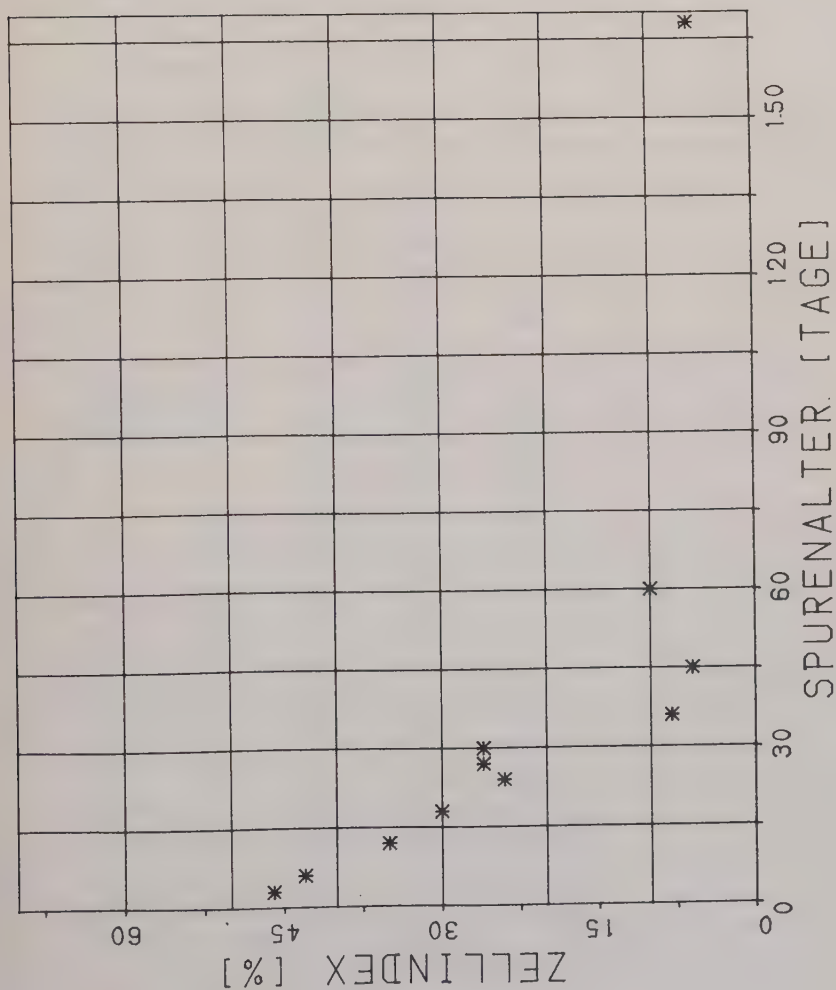
BILD
5

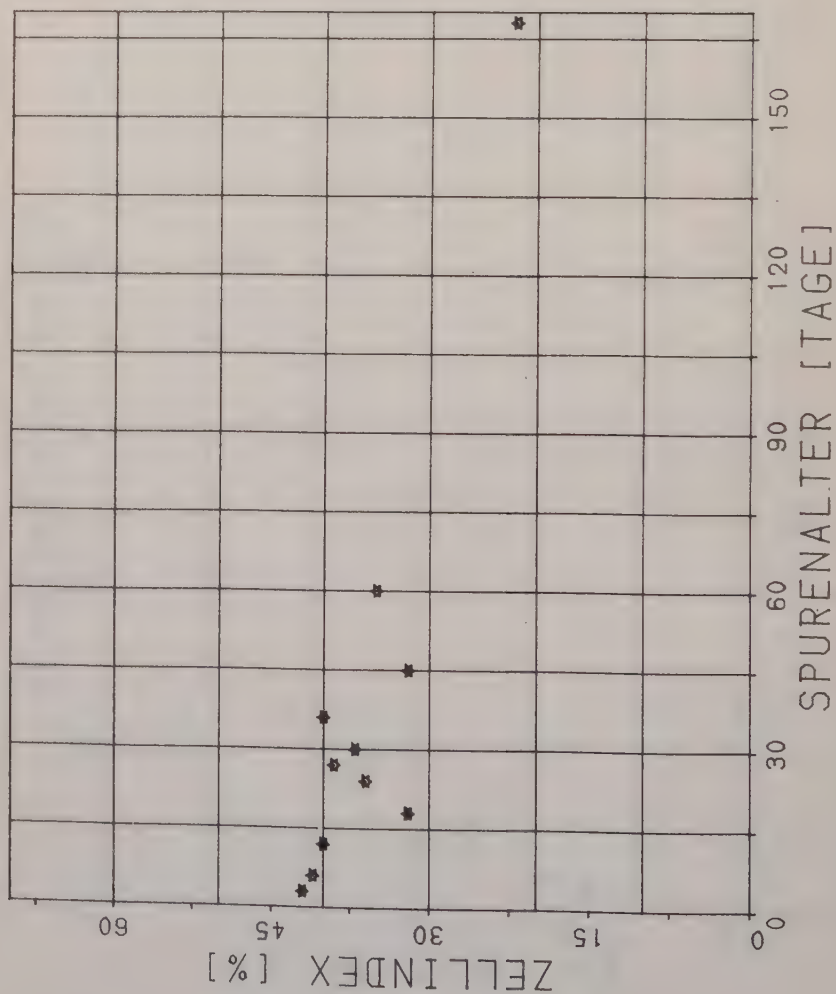




ERGEBNIS
SPUR 7

BILD
7





3.5. Mittelwertbestimmung und Vergleich mit den Einzelkurven

Bild 9 bietet das Gesamtergebnis auf einen Blick. Es ist allerdings wenig aufschlußreich, da Ausgangswert und Verlauf der einzelnen Kurven zu unterschiedlich sind. Um die gemeinsame Tendenz der Kurven herauszuheben, werden in Tabelle III die errechneten Mittelwerte ($\bar{x}$) der acht Spuren mit Standardabweichung nach oben (δ_+) und unten (δ_-) gezeigt.

Tabelle III	Tage	$\bar{x}$	δ_+	δ_-	
Mittelwertbestimmung	3	49,4	56,0	42,7	(% F-Body)
	6	47,1	54,2	40,0	
	15	43,1	49,9	36,3	
	18	43,6	52,6	34,6	
	24	36,4	43,6	29,3	
	27	37,5	45,2	29,8	
	30	35,1	40,6	29,6	
	36	32,6	44,2	21,0	
	39	34,4	41,2	27,6	
	45	29,4	39,3	19,5	
	51	29,6	35,6	23,6	
	60	26,8	34,7	19,0	
	72	25,2	37,5	12,9	
	78	22,2	27,9	16,5	
	93	16,4	21,9	10,9	
	159	13,9	19,0	8,8	

Dabei werden die Werte des 15. bzw. 159. Tages von Tabelle I mit den Werten des 12. bzw. 169. Tages der Tabelle II zusammengefaßt. Die Mittelwerte des 39., 51., 72., 78., und 93. Tages setzen sich natürlich nur aus den jeweils fünf Werten der Tabelle I zusammen. Die graphische Darstellung der Tabelle III zeigt Bild 10 (Mittelwerte) und Bild 11 (Mittelwerte mit Standardabweichung der ersten drei Monate). Nach dem oben beschriebenen Modus wurde auch diese Kurve ausgewertet:

Mittelwerte der Spuren 1 bis 8 siehe Bild 10

	A(3.-30.)	B (30.-60.)	C (3.-60.)	D (3.-93.)	E(3.-159.)
b	51	44	49	48	44
m	0,52	0,28	0,40	0,35	0,23
a ₀	97	156	121	137	190
a ₁₀	78	120	96	108	147
r	0,97	0,94	0,97	0,97	0,92

Beschreibung der Mittelwerte-Kurve

Auffällig ist zunächst einmal der hohe Korrelationskoeffizient r , was beweist, daß die Mittelwerte-Kurve näherungsweise recht gut durch eine Gerade, bzw. durch aufeinanderfolgende Streckenabschnitte beschrieben

werden kann. Sodann zeigt sich, daß die Steigung der Kurve mit zunehmendem Spurenalter deutlich abnimmt. Die Gerade durch die Kurvenpunkte 3.- 30. Tag (Spalte A) weist mit 0,52 eine fast doppelt so hohe Steigung m auf wie die Gerade durch die Kurvenpunkte 30. - 60. Tag mit 0,28 (Spalte B). Folgerichtig hat dann eine Kurve durch die Punkte 3. - 60. Tag einen Wert dazwischen (0,40, Spalte C). Die Kurvensteigung nimmt dann, etwas langsamer, weiter ab, so daß die Steigung der Geraden der Punkte 3. - 93. Tag und 3. - 159. Tag 0,35 (Spalte D) bzw. 0,23 (Spalte E) beträgt.

Fazit: Die Kurve der Mittelwerte ist wahrscheinlich eine hyperbolische Funktion mit einem Anfangswert von etwa 51, die sich anfangs, vor allem in den ersten 30 Tagen, wie eine Gerade der Steigung 0,52 verhält, danach bei stetig sinkender Steigung in eine Asymptote übergeht mit Steigung 0 und einem Ordinatenwert etwa zwischen 5 und 10 Prozent.

Die halblogarithmische Darstellung der Ergebnisse (Bild 12) und der Mittelwerte (Bild 13) scheint die obige These zu bestätigen, denn die Mittelwert-Kurve hat einen sigmoiden Verlauf. Bei einigen Einzelkurven, vor allem bei Spur 7, aber auch bei Spur 3 und 4 (siehe Bild 12) ist der sigmoide Charakter noch deutlicher zu sehen.

Vergleich der Mittelwert-Kurve mit den Einzelkurven

Die Einzelkurven kann man in zwei Gruppen einteilen:

1. Gruppe: Spur 2,3,4,5,6,
verhalten sich ähnlich der Mittelwertkurve
2. Gruppe: Spur 1,7,8,
"Ausreißer"-Kurven, die sich deutlich von
der Mittelwertkurve unterscheiden.

ad 1: Charakterisierung der "Normal"-Kurven:

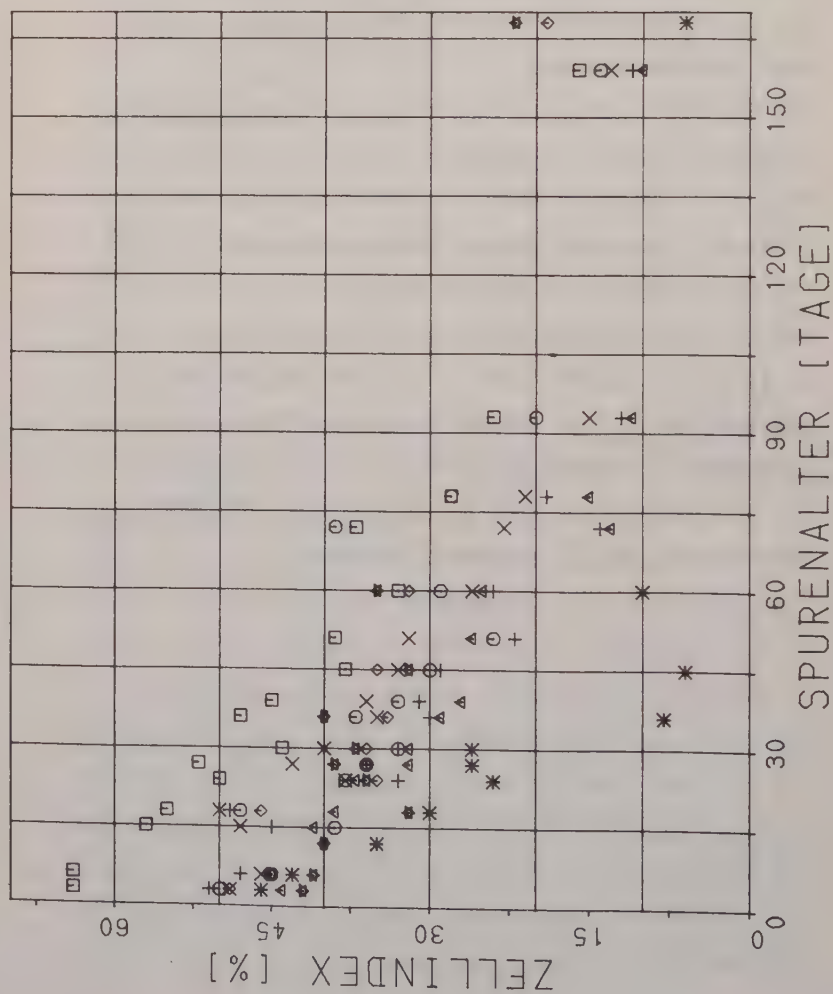
Die Kurven haben Anfangswerte zwischen 44 und 50 (vgl. Mittelwert-Kurve:49), die Anfangssteigung liegt zwischen 0,32 und 0,68 (0,52), die Steigung unter Spalte C (3.- 60.Tag) zwischen 0,28 und 0,50 (0,40) und die Steigung unter E (3. - 159. Tag) zwischen 0,16 und 0,29 (0,23).

ad 2: Charakterisierung der "Ausreißer"-Kurven:

Spur 1 fällt völlig aus dem Rahmen, weil der Anfangswert 64 wesentlich höher ist als bei den anderen Kurven (der zweithöchste Wert, Spur 2, beträgt 50). Auch die einzelnen Steigungswerte liegen höher als bei allen anderen Kurven der 1. Gruppe. Außerdem wurde bei Spur 1 des öfteren in einem Spermatocyt zwei Y-Bodies entdeckt. Spur 7 fällt auf durch die extrem hohe Anfangssteigung von 0,80 (Mittelwert 0,52) und Steigung der ersten 60 Tage von 0,73 (0,40). Diese Spur scheint schon nach ca.

eineinhalb Monaten einen Basiswert erreicht zu haben, der etwa zwischen 6 Prozent und 10 Prozent liegt. Da gerade diese Spur wegen ihrer hohen Spermiedichte gut auszählbar war, erscheint dieses Ergebnis besonders bemerkenswert.

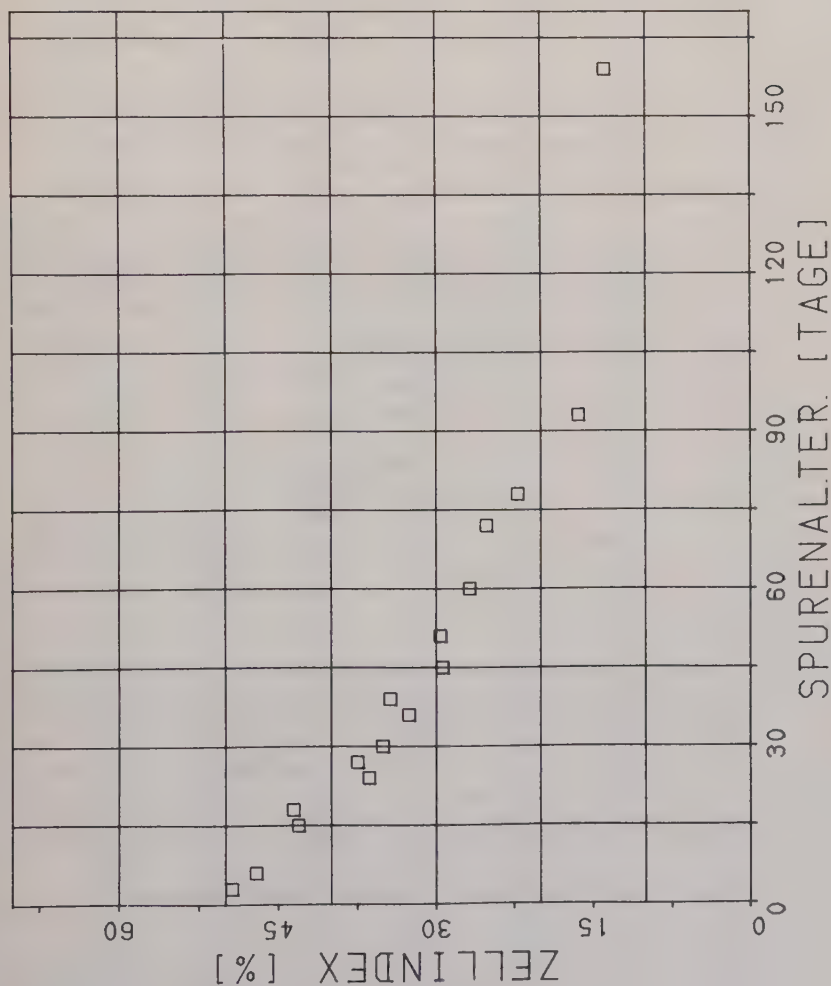
Das Gegenteil von Spur 7 finden wir in Spur 8, nämlich eine sehr niedrige Anfangssteigung von 0,18 (Mittelwert 0,52). Deshalb finden wir nach 60 Tagen mit einem Zellindex von 35 Prozent einen Wert, der größer ist als die untere Standardabweichung des 18. Tages (34,6 %) und der Schlußwert nach 168 Tagen von 22 Prozent liegt höher als die untere Standardabweichung des 36. Tages (21,0 %). Eine Gerade durch die Wertepaare der ersten 60 Tage würde die 10 Prozent-Grenze erst nach ca. 260 Tagen, also nach 8 1/2 Monaten, erreichen (Mittelwert: 96,7, also etwa 3 Monate).



SPUR 7
+ SPUR 4
SPUR 1

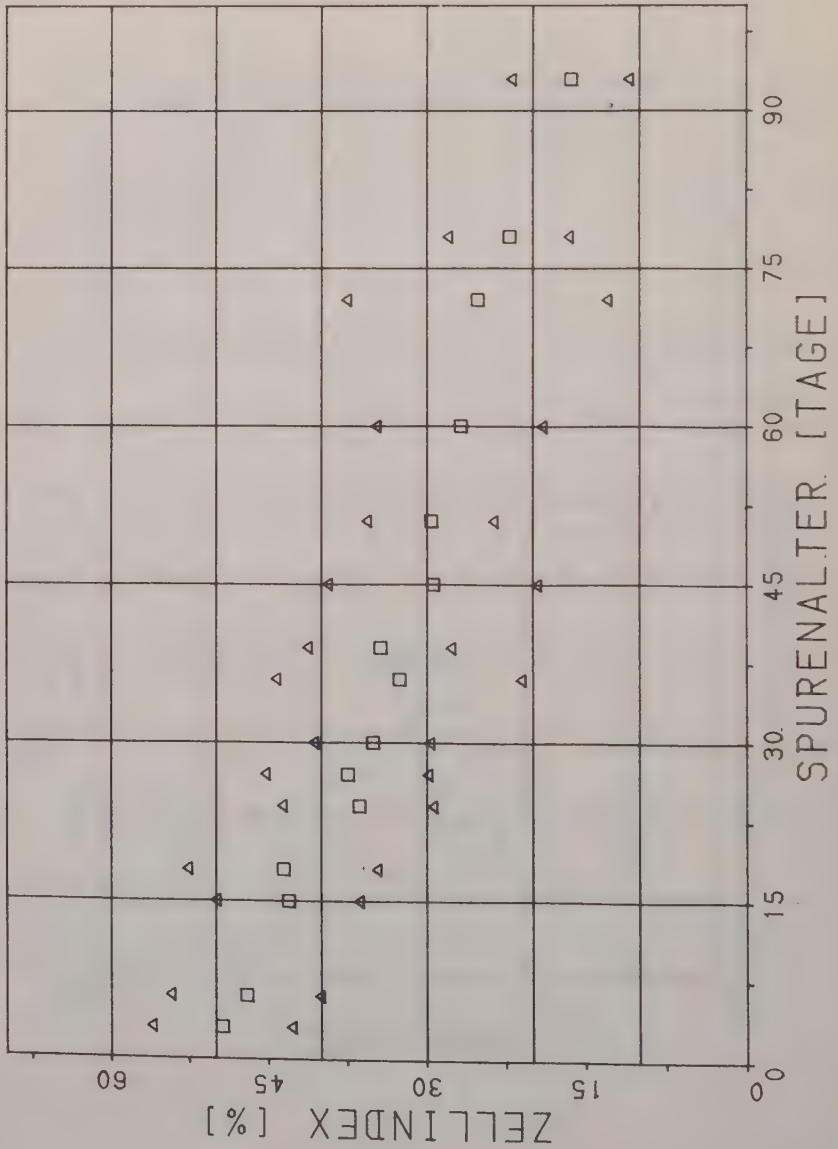
SPUR 8
x SPUR 5
o SPUR 2

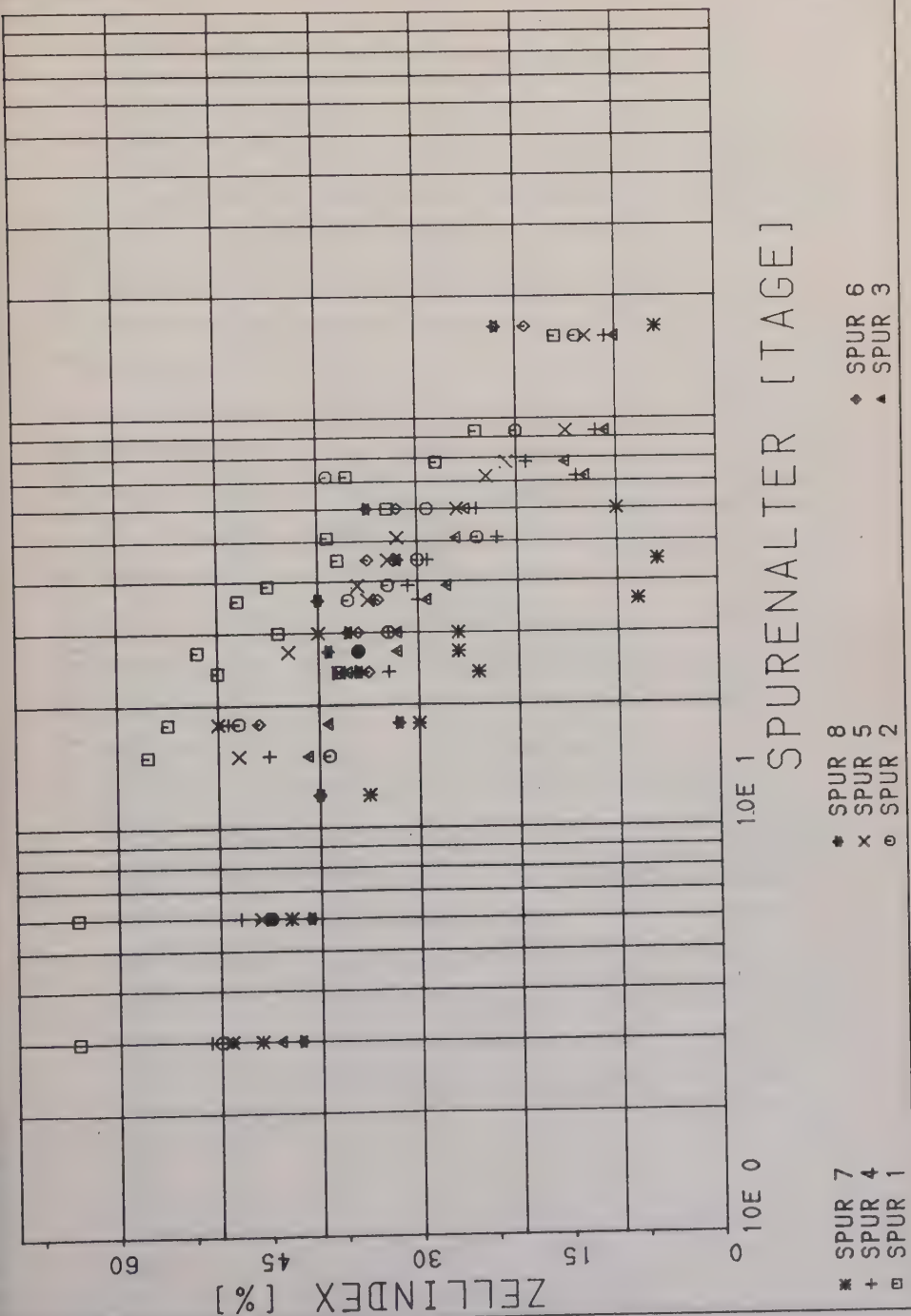
SPUR 6
diamond SPUR 3
triangle

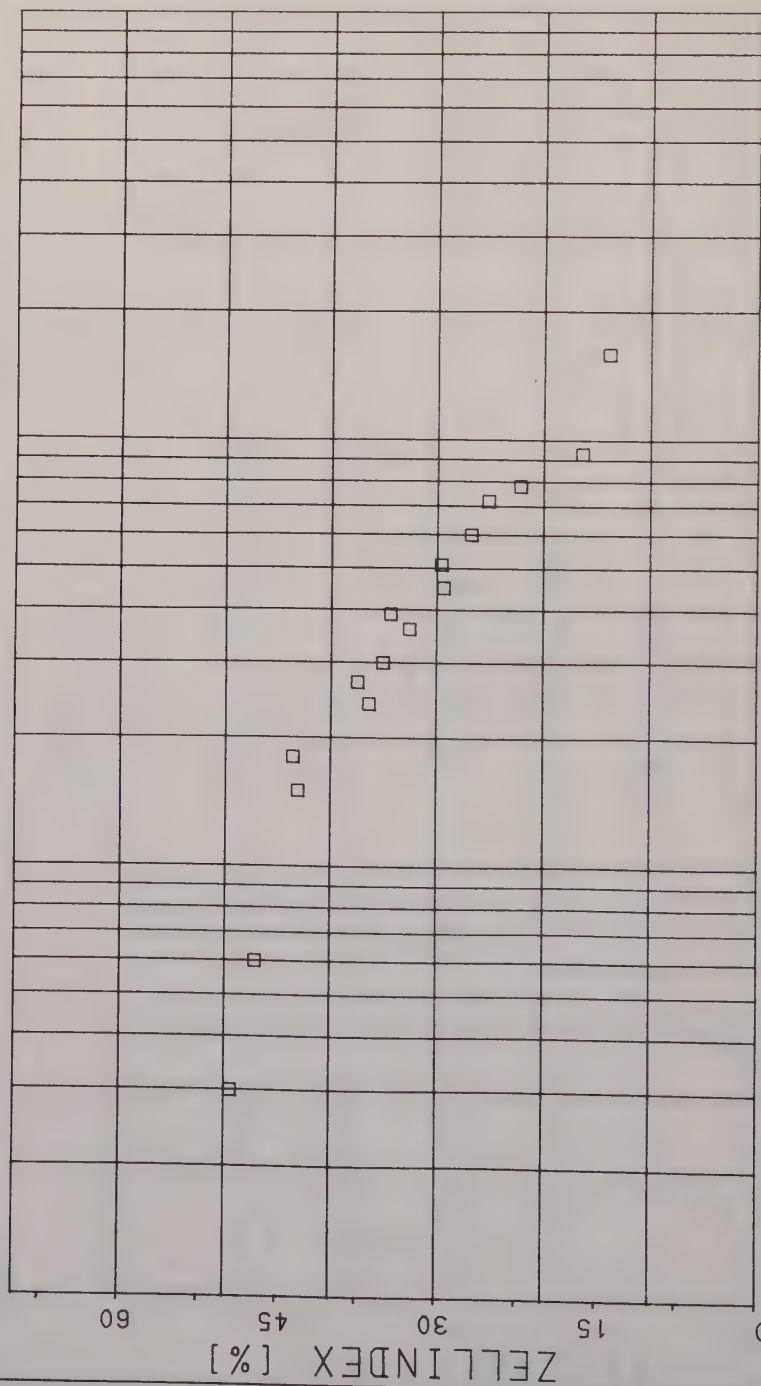


MITTELWERTE MIT STANDARDABW.

BILD
11







4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß sich Spermaspuren im Laufe der Zeit nach gewissen Gesetzmäßigkeiten verändern. Die Ursache dafür ist noch ungeklärt. Nach SCHWINGER (28) gibt es dafür zwei Hypothesen: Entweder lösen sich mit zunehmendem Alter nach dem Gewebetod Chromatinstrukturen auf, oder das Y-Chromosom verliert seine spezifische Anfärbbarkeit für Acridinderivate.

Bei den hier untersuchten acht angelegten Spuren nahm der nach Fluorochromierung ausgezählte Zellindex bei zunehmender Liegedauer annähernd linear ab.

Dies wird durch Bild 10, die Kurve der Mittelwerte, deutlich illustriert. Sie zeigt, daß der Zellindex von einem Wert zwischen 45 Prozent und 50 Prozent innerhalb von 90 Tagen auf ca. 16 Prozent absinkt.

Trotzdem scheint es problematisch zu sein, diese Methode zur Altersbestimmung von Spermaspuren heranzuziehen. Denn es hat sich gezeigt, daß dem einige technische und systemische Probleme entgegenstehen.

Da ist zunächst die technische Seite anzusprechen. Es hat sich erwiesen, daß es keineswegs immer gelingt, Präparate in stets gleicher Güte herzustellen und auszuwerten. Folgende Faktoren spielen hierfür eine Rolle:

Die Zelldichte und der Grad der Verunreinigung ist nicht an allen Stellen des Spermaflecks auf den Leinenlappen gleich. Auch ist der manuelle Extraktionsvorgang aus dem Textilstück mittels der 25prozentigen Essigsäure nicht hundertprozentig zu standardisieren. Die Färbelösung von Quinacrine Mustard verändert sich, obwohl sie im Kühlschrank gelagert und häufig filtriert wurde, um Ausflockungen zu beseitigen. Die Zeit zwischen Färbeprozedur und mikroskopischer Auswertung konnte nicht immer gleich lang bemessen werden. Trotz Abdichten des Deckglases mit Nagellack könnte das zu Ungenauigkeiten führen. Ein weiterer Faktor ist der optische Zustand des Fluoreszenzmikroskops. Durch die Verwendung des Immersionsöls besteht die Gefahr der Trübung der Frontlinse. Deshalb muß sie vor und nach jedem Mikroskopieren gereinigt werden. Dabei haben sich Styroporschnipsel bewährt. Als letzten, aber nicht unwichtigsten Punkt muß noch die Beobachtungsexaktheit genannt werden. Sie wird wohl von Beobachter zu Beobachter unterschiedlich sein und auch bei demselben Beobachter nicht immer konstant sein. Des weiteren hängt sie auch sehr von der Erfahrung des Untersuchers ab, was bei dem Thema "falsch positive Befunde" noch anzusprechen sein wird.

Ein weiteres Problem dieser Methode der Altersbestimmung ist systemischer Natur. Es hat sich schon bei diesen acht Proben gezeigt, daß die Ausgangswerte recht unterschiedlich sind, sie nämlich von 42 Prozent bis 64 Prozent (Mittelwert $49 \% \pm 6,6 \%$ Standardabweichung) variieren. Die Ergebnisse anderer Autoren bestätigen dies. LESLIE et al. (16) geben bei 50 Proben einen Mittelwert von 37 Prozent und eine Bandbreite von 10 Prozent bis 63 Prozent an. Sie teilen weiterhin mit, daß bei 6 Prozent der Probanden mehr als 50 Prozent der ausgezählten Spermatozyten Y-Bodies aufwiesen, während weitere 6 Prozent einen Zellindex von weniger als 20 Prozent hatten. KEGEL et al. (13) untersuchten jeweils drei Proben von vier Männern und veröffentlichten folgende Resultate: Mittelwert 45 Prozent $\pm 4,0$ bei einer Bandbreite von 38 Prozent bis 51 Prozent. Eine etwas geringere Streuung zeigten Versuche von PAWLOWITZKI (21), die sie an Spermaproben von elf Männern durchführten. Diese ergaben einen Mittelwert von 45,4 Prozent im Bereich von 42,2 Prozent bis 49,4 Prozent, wobei jeweils ca. 1000 Spermatozyten ausgezählt wurden. Ließe man bei den eigenen Versuchen die Spur Nr. 1 außer Betracht, so enthielte man mit 47,3 Prozent im Bereich von 42 Prozent bis 50 Prozent

nahezu dasselbe Resultat wie PAWLOWITZKI et al. (21).

Ein weiterer Grund, warum eine Altersbestimmung von Spermaflecken mittels der Fluorochromierung problematisch ist, hängt mit dem zeitlichen Verlauf der Kurven zusammen. Die Versuche ergaben nämlich, daß deren Verlauf nicht einheitlich ist. Verglichen mit der Mittelwertskurve verlaufen zwei Kurven (Spur 1 und Spur 7) deutlich steiler und eine Spur (8) flacher, während die anderen fünf Kurven sich ähneln. Die Steigungen der durchgelegten Geraden belegen dies durch Zahlen. Die Steigung einer Gerade durch die Kurvenpunkte der ersten 30 Tage (bzw. 60 Tage) variiert bei diesen fünf Spuren zwischen 0,32 und 0,68 (0,28 und 0,50), bei der Mittelwertkurve liegt er bei 0,52 (bzw. 0,40). Bei Spur 1 lauten die entsprechenden Steigungswerte 0,75 (bzw. 0,55) und bei Spur 7 gar 0,80 (bzw. 0,73), während Spur 8 den Wert 0,18 (bzw. 0,12) aufweist. Man muß also in Betracht ziehen, daß die Abnahme des Zellindex individuell unterschiedlich schnell verlaufen kann.

Als weiteres Hindernis muß noch erwähnt werden, daß es immer schwieriger wird, gute Präparate herzustellen, je älter die Spur wird. Dabei wird die Gefahr größer, daß falsch positive Ergebnisse erscheinen.

Ursache dafür können Artefakte sein, die ein Fluoreszenz-Körperchen vortäuschen können. Zwar sind sie meist von größerer Leuchtkraft und schärfer begrenzt als ein Y-Body. Diese Unterscheidungs-Merkmale nehmen aber mit längerer Liegedauer ab, und nur ein geübter Beobachter kann sie dann als Artefakte identifizieren.

Falsch positive Resultate können eventuell auch durch andere Chromosomen hervorgerufen werden, die, zwar in wesentlich geringerem Maße als das Y-Chromosom, nach Anfärbung mit Acridin-Derivaten stark fluoreszieren. In Frage kommen dafür nach MÖLLER et al. (20) vor allem das Chromosom Nr. 3, aber auch die akrozentrischen Chromosomen. SCHNEDL (25) gibt in diesem Zusammenhang an, daß die Homologen des Chromosoms Nr. 3 beim Menschen ein unterschiedliches Fluoreszenzmuster haben können. Man könnte mit dieser Erkenntnis den Fall konstruieren, daß von 100 Spermatozyten 50 Prozent ein Y-Body, aber auch 50 Prozent ein stark fluoreszierendes Chromosom Nr. 3 haben. Rein rechnerisch ergäbe das 75 Prozent Spermatozyten mit einem oder zwei leuchtenden Punkten und 25 Prozent ohne einen leuchtenden Punkt. Falls man annimmt, daß jeweils weniger als 50 Prozent sichtbar sind, wäre

das eine mögliche Erklärung für den ungewöhnlich hohen Anfangswert von Spur 1 von 64 Prozent. Genau diesen Wert erhielte man, wenn jeweils 40 Prozent sichtbar wären.

Ob sich allerdings das Färbeverhalten solcher Chromosomen bei längerer Liegedauer ähnlich verhält wie das Y-Chromosom, muß hier offen bleiben.

5. Zusammenfassung

Acht auf Leinenlappen angelegte Spermaspuren wurden mit dem Ziel untersucht, einen Zusammenhang zwischen Liegedauer und Zellindex herzustellen. Der Zellindex ist definiert als der prozentuale Anteil der Y-Bodies enthaltenden Spermatozyten und wurde nach Fluorochromierung mit Quinacrine Mustard ermittelt.

Dabei wurde gezeigt, daß der Zellindex von einem Mittelwert von 49 Prozent nach ca. 5 Monaten auf 14 Prozent absank. Die graphische Darstellung der Mittelwerte ergab eine hyperbolische Funktion, die näherungsweise auch durch eine Gerade dargestellt werden kann. Es wurde dargelegt, daß es nicht ohne weiteres möglich ist, aus einer solchen Kurve Rückschlüsse auf die Liegedauer von Spermaflecken zu ziehen.

6. Literaturverzeichnis

1. BARLOW, P., C.G. VOSA: The Y-Chromosome in human
Spermatozoa
Nature (London) 961 (1970)
2. BERGHAUS, G., Geschlechtsbestimmung an
U. REIFENBERG, Skeletteilen, Z.Rechtsmedizin
G. DOTZAUER: 72, 255-268 (1973)
3. BRINKMANN, B. Bestimmung des Kerngeschlechts
U. JOBST: an biologischen Spuren
Z. Rechtsmedizin 73, 1 - 6
(1973)
4. BÜHLER, E.M. Heterochromatin, Fluoreszenz
HJ. MÖLLER, und Strukturanomalien des
G.R. STALDER: Y-Chromosoms
Archiv für Genetik 45, 27-34
(1972)
5. CASPERSSON, T., Chemical differentiation along
S.FABER, G.E. FOLEY, metaphase Chromosomes,
J. KUDYNOWSKI, Exptl. Cell Res. 49 , 219-222
E.J. MODEST, (1968)
E. SIMONSSON, U. WAGH,
L.ZECH

6. CASPERSSON, T., L. ZECH, E.J. MODEST, G. E. FOLEY, U. WAGH, E. SIMONSSON: chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia Faba* metaphase Chromosomes. Exptl. Cell Res. 58, 128-140 (1969)
7. CASPERSSON T., L. ZECH, E.J. MODEST, G.E. FOLEY, U. WAGH, E. SIMONSSON: DNA-binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nudeus. Exptl. Cell Res 58, 141-152 (1969)
8. CASPERSSON, T., L. ZECH, C. JOHANSSON, E.J. MODEST: Identification of human Chromosomes by DNA-binding fluorescent agents Chromosoma (Berlin) 30, 215-227 (1970)
9. CASPERSSON, T., L. ZECH, C. JOHANSSON: Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes Exptl. cell. Res. 60, 315-319 (1970)
10. CASPERSSON, T., L. ZECH, C. JOHANSSON: Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents Exptl. Cell Res. 62, 490-492 (1970)
11. HERBICH, J., K. MEINHART: Fluoreszenz optischer Nachweis des Y-Chromosoms in isolierten Gewebszellkernen Ärztl. Lab. 18, 328-331 (1972)

12. KAISER, R., K. H. BROER,
P. CITOLER, B. LEISTER: Nachweis Y-Chromatin
positiver Spermien im
Zervixsekret beim In-vitro-
Penetrationstest
Geburtsh. u. Frauenheilk.
34, 426-430 (1974)
13. KEGEL, J., P. E. CONEN: Nuclear Sex identification
in human tissues
amer. J. clin. Path. 57,
425 (1972)
14. KIM, A., L. BIER: Identification and localisation
of the Y-Body in interphase
by Quinacrine and Giemsa
Humangenetik 16, 261-265 (1972)
15. KOVACS, M., L. HARSANYI,
M. SELLYEI: Y-Body in all nuclei of
parenchymatous organs
Z. Rechtsmedizin 71, 104-107
(1972)
16. LESLIE, W., G. QUINLIVAN,
H. SULLIVAN: The ratios and separation of
x and y spermatozoa in human
semen
Fertil. and steril. 22, 15
(1974)
17. MAJEWSKI, F., L. BIER,
R. A. PFEIFFER: Fluoreszenz-mikroskopischer
Nachweis des menschlichen
Y-Chromosoms im Interphasekern
durch Akridinderivate
klin. Wschr. 49, 814 (1971)

18. MOSCETTI , G., F.MASTROIANNI: Fluorescent staining
of the male chromatin
body in interphase of
human nuclei
acta Genet.med.(Roma) 3,
256 - 259 (1971)
19. MOSCETTI, G. Observations in human
spermatozoa by fluorescent
"Acranil" staining
Humangenetik 17, 75-77
(1972)
20. MÜLLER, H. J., E.M. BÖHLER Erfahrungen mit der fluo-
M. G. VOEGELIN, G.R.STALDER: reszenzmikroskopischen
Erfassung des menschlichen
Y-Chromosoms in Interphase-
kernen verschiedener Gewebe
Archiv f. Genetik 45,
35-48 (1972)
21. PAWLOWITZKI, I.H., Chromosomal Aneuploidy in
P. L. PEARSON: human spermatozoa,
Humangenetik, 16, 119-122
(1972)
22. PEARSON, P.L., M. BOBROW, Technique for identifying
C.G. VOSA: Y-Chromosomes in human
interphase nuclei
Nature (London) 226, 78-80
(1970)

23. PEARSON, P. L., M. BOBROW: The Y-chromosome in human spermatozoa.
Nature (London) 226, 961-962 (1970)
24. ROHDE, W., T. PORSTMANN, R. Zillmann, G. DÖRNER: Zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis des Y-Chromosoms in unbehandelten und trypsinbehandelten menschlichen Spermien.
Acta.biol.med.germ. 28, 189-197 (1972)
25. SCHNEDL, W.: Fluoreszenzuntersuchungen über die Längenvariabilität des Y-Chromosoms beim Menschen.
Humangenetik 12, 188-194 (1971)
26. SCHNEDL, W.: Unterschiedliche Fluoreszenz der beiden homologen Chromosomen Nr. 3 beim Menschen.
Humangenetik 12, 59-63 (1971)
27. SCHWINGER, E.: Neue Methoden zur Geschlechtsbestimmung.
Kriminalistik und forensische Wissenschaften 6, 145-148 (1971)

28. SCHWINGER, E.: . Bedeutung und gerichtsmedizini-
sche Anwendung der DNS-
Fluorochromierung von Chromo-
somen und Zellkernen. Arbeits-
methoden der medizinischen und
naturwissenschaftlichen Krimi-
nalisitik, Band 13, Verlag
Schmidt-Römhild, Lübeck 1975
29. SCHWINGER, E. F. PERA: On the splitting of the Y-
fluorescent body in man
Humangenetik 14, 109-111 (1972)
30. TRÖGER, H.D., Zur zeitlichen Nachweisgrenze
E. LIEBHARDT: des Y-Chromosoms an Blutspuren
und Haaren, Wiener Beitr. zur
gerichtl. Med. 17, 159-162
31. WEINIG, E.: Eine Methode zur Altersbestim-
mung von Blut- und Sperma-
flecken, Deutsche Zeitschrift
für gerichtl. Medizin, 43,
1-10 (1954)
32. ZECH, L.: Investigation of metaphase
Chromosomes with DNA-binding
fluorochromes.
Exptl. Cell. Res. 58, 463
(1969)

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Spann
und Herrn Professor Dr. Tröger für die Überlassung
des Themas, sowie Fräulein Schmidt für ihre freundliche
Hilfe im cytologischen Labor.

Lebenslauf

Am 8. November 1953 wurde ich als Sohn des Ehepaares Erwin und Friederike Satzger in Fürstenfeldbruck geboren. Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Volksschule in Moorenweis. Anschließend trat ich in das Dominikus-Zimmermann-Gymnasium in Landsberg/Lech über. 1966 wechselte ich zum Holbein-Gymnasium in Augsburg. Im Juni 1972 legte ich am gleichen Gymnasium das Abitur ab.

Vom Juli 1972 bis März 1973 leistete ich einen Teil meines Grundwehrdienstes ab.

Im Sommersemester 1973 begann ich das Studium der Zahnheilkunde an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Nach der naturwissenschaftlichen Vorprüfung im April 1974 und der zahnärztlichen Vorprüfung im Oktober 1976 legte ich zwischen August 1979 und Januar 1980 die zahnärztliche Prüfung ab. Im Februar 1980 erhielt ich die Bestallung als Zahnarzt.

Danach arbeitete ich als Ausbildungsassistent in einer zahnärztlichen Praxis in Landsberg. Seit Januar 1981 leiste ich den restlichen Teil meines Grundwehrdienstes als Truppenzahnarzt in Regen ab.

